

ラットインターロイキン2レセプター発現T細胞ハイブリドーマの 確立とその調節機構の解析

幸 田 弘 信 上 出 利 光

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩造 教授)

Construction of Rat-Mouse T Cell Hybridomas That Express the Rat Interleukin 2 Receptors and Analysis of Mechanisms Involved in the Regulation of Their Expression

Hironobu KOHDA and Toshimitsu UEDE

Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. K. Kikuchi)

Spleen cells obtained from Lewis rats were cultured with 4 $\mu\text{g/ml}$ Con A for 96 hr and the activated cells were fused with BW5147, mouse T lymphoma cells. Three clones were obtained by fusion and expressed the rat interleukin 2 receptor (IL-2R). The expression of rat IL-2R on those hybrid cells could be up-regulated by supernatants of Con A activated spleen cells (condition medium; CM), IL-2 absorbed CM and IL-2 itself. IL-2R on hybrid cells could be down-regulated by murine monoclonal antibody, ART-18 that detects rat IL-2R. T cell hybridomas could express the rat IL-2R with high ($K_d=109.6 \text{ pM}$) and low ($K_d=5.35 \text{ nM}$) affinity for recombinant IL-2. Incubation of hybrid clones with IL-2 resulted in the proliferation of hybrid cells, whereas the proliferation of some clones was inhibited by IL-2, indicating that IL-2 had bifunctional properties on cell growth.

All hybrid clones produced IL-2 constitutively. IL-2 produced by hybrid cells were bound to its receptor and promoted the proliferation of hybrid cells in some clones.

The increased expression of IL-2R and secretion of IL-2 induced by the synergistic action of Ca^{++} ionophores and TPA indicated the importance of the Ca^{++} dependent protein kinase C in the T cell activation.

Rat IL-2R from Con A activated rat T cells and T cell hybridomas were studied by both one- and two-dimensional SDS-PAGE with ART-18. The IL-2R derived from Con A activated rat T cells had 72-77 kd minor and 40-48 kd major components under non-reducing conditions and had 50-56 kd major and 35-38 kd minor components under reducing conditions. The 35-38 kd minor components in reducing conditions were derived from 40-48 kd major components in non-reducing conditions.

The IL-2R derived from T cell hybridomas had 110 kd, 72-77 kd and 45-48 kd components under non-reducing conditions and had 110 kd, 50-56 kd and 35-38 kd components under reducing conditions. The 110 kd components, the third component of rat IL-2R was constantly observed in T cell

Abbreviations :

MoAb	: monoclonal antibody	SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
CTL	: cytotoxic T lymphocyte	NEPHGE	: non-equilibrium pH gradient electrophoresis
TCGF	: T cell growth factor	kd	: kilodaltons
IL2	: interleukin b	kd	: dissociation constant
IL2R	: interleukin 2 receptor	PMA	: phorbol myristate acetate
ATL	: adult T cell leukemia		
ADF	: adult T cell leukemia-derived factor		
HTLV	: human T-lymphotropic retrovirus		

hybridomas.

The rat IL-2R derived from Con A activated normal rat T cells was found to have a pI between 5.0–5.6 and 6.0–6.4, whereas the rat IL-2R derived from T cell hybridomas was found to have a pI between 6.0–6.4. T cell hybridomas expressed an aberrant IL-2R on their cell surface. The aberrant IL-2R had a molecular weight of 40 kd under reducing conditions and a pI between 5.6–6.2.

(Received June 28, 1986 and accepted August 11, 1986)

Key words: T cell hybridoma, Interleukin 2, Interleukin 2 receptor, Protein kinase C, Monoclonal antibody

1 結 言

T細胞は、多様な機能をもつことが知られているが、免疫応答の際特定の機能を発揮するためには、特定のT細胞クローンの増殖が必要である。それゆえ、リンパ球の活性化と増殖に関与する細胞学的、分子学的機構を解明することは、T細胞の多様な機能を解析する上できわめて重要な問題である。しかも、最近、growth factorやそれに対するレセプターがoncogene productであるとの報告が続き、IL-2(interleukin 2)及びIL-2R(interleukin 2 receptor)を解析することは、正常細胞増殖ばかりでなく、癌細胞増殖機構を解析する上でも意味深い。抗原や mitogen によりリンパ球を活性化すると、IL-2R やトランスフェリンレセプターなど新しい細胞表面抗原の発現誘導が認められる¹⁻⁴⁾。ホルモン様増殖因子としてのIL-2は、活性化T細胞の増殖刺激として働くが、その生物学的活性を発揮するためには、IL-2がIL-2Rに結合しなければならない。このようなT細胞の活性化と増殖という生物学的現象を解明するためには、IL-2Rを分離することとIL-2R発現の調節機構を研究しなければならない。最近、マウス、ラット、ヒトのIL-2Rに対するMoAb(monoclonal antibody)、7D6⁵⁾とAMT-13⁶⁾、ART-18⁷⁾、anti Tac¹⁾が報告され、IL-2Rの解析が著しい進歩をとげている。しかし、これらの対象となるT細胞は、多くの亜群からなっており、クローンレベルでIL-2R発現の調節機構を解析することができなかった。本論文では、ラットの調節的IL-2Rを発現しているラットーマウスT細胞ハイブリドーマを確立し、ラットのIL-2Rの生物学的性状を明らかにするとともに、クローンレベルのIL-2R発現調節機構を解明したので報告する。

2 実験方法

2.1 実験動物と培養細胞

実験には、静岡動物センターから購入した6~8週の

Lewisラットを使用した。HPRT-deficient AKR thymoma cell(BW5147)は、Dr. Mark Greene, Tuft University, USA から供与された。HTLV-1 transformed rat lymphocyte 由来の細胞株 TART は、市立札幌病院病理の吉木博士により供与された。

2.2 抗体と試薬

抗ラットモノクローナル抗体として、教室の松浦らが作製したRI-3B3⁸⁾、RT-1⁹⁾を用いた。RI-3B3は、ラットのLyt-1細胞、RT-1は、ラットのHLAを認識する抗体である。ラット、マウスのIL-2Rを認識するモノクローナル抗体としてDr. H. Osawaらより供与されたART-18⁷⁾とAMT-13⁶⁾を使用した。ヒトIL-2Rを認識するモノクローナル抗体antiTac抗体は、京都大学医学部第一内科の内山博士より供与された。Human recombinant IL-2の¹²⁵Iによる標識は、Bolton-Hunter法¹⁰⁾により行った。その他、normal rat serum coupled Sepharose 2Bで十分吸収¹¹⁾したFITC conjugated goat anti-mouse Ig(Meloy Lab)及びFITC conjugated rabbit anti-rat Igを使用した。

2.3 ラットーマウスT細胞ハイブリドーマの作製

Lewisラットの脾細胞をcomplete medium (10% fetal calf serum, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 加 RPMI1640)に 5×10^6 /ml となるように浮遊させ、4 μ g/ml のCon A(Concanavalin A, Pharmacia)を加えて37℃96時間培養後、Ficoll-Conray比重遠心法¹²⁾(比重1.096)によりblast化したリンパ球を分離した。この分離したCon A blast脾細胞とBW5147を前述の方法^{13,14)}に準じてT-T細胞融合を行った。Con A blast脾細胞 5×10^7 個とBW5147 5×10^7 個を50% PEG4000(polyethylene glycol 4000, Sigma), 5% DMSO(dimethylsulfoxide)を含むRPMI1640培養液1mlに浮遊させ、37℃2分incubationし、徐々にRPMI1640培養液を加えた。細胞は、HAT(1×10^{-4} M

hypoxanthine, 4×10^{-7} M aminopterin, 1.6×10^{-5} M thymidine) を含む complete medium に浮かせ, BALB/c マウス脾細胞を feeder として加え, 96 well culture plate にて培養した. 得られたクローンは, 2~3 週間 HAT 加 complete medium で培養し, limiting dilution technique でクローニングを行った.

2.4 FACS による解析

T 細胞ハイブリドーマ $1 \sim 2 \times 10^6$ 個に一次抗体として種々の MoAb を $10 \mu\text{l}$ 加え, 4°C 45 分 incubation した. PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2) で 3 回洗浄後, 二次抗体として FITC conjugated goat anti-mouse Ig を加え 4°C 30 分 incubation した. PBS で 2 回洗浄後 1 ml の sheath fluid (Clay Adams Laboratory Systems) に浮遊し, FACS (fluorescence activated cell sorter, Becton-Dickinson) にて解析を行った.

2.3 CM の作製と IL-2 吸収

Lewis ラットの脾細胞を $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で complete medium に浮遊させ, $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A の存在で 37°C 36 時間培養した. この培養上清を同量の Sephadex G-100 で 4°C 18 時間 incubation し, Con A を吸収し, CM (condition medium) として使用した. IL-2 の吸収には, $2 \times 10^6/\text{ml}$ の脾細胞を $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A で 3 日間培養し, 十分に IL-2 依存性となった blast 細胞を用いた. 1×10^8 個の blast 細胞に対して 30% CM 1 ml の割合で 4°C 2 時間吸収したものを IL-2 吸収 CM として使用した.

2.6 IL-2 assay

IL-2 活性の測定には, BALB/c mouse thymocyte co-stimulation assay¹⁵⁾ 及び IL-2 dependent CTL を用いた¹⁶⁾.

2.7 Scatchard plot analysis

IL-2R 陽性 T 細胞ハイブリドーマの IL-2 に対する親和性の解析には, ^{125}I 標識 IL-2 を用いた binding assay にもとづき, Scatchard plot analysis¹⁷⁾ により解離定数 (Kd) を求めた. 3×10^6 の T 細胞ハイブリドーマに ^{125}I 標識 IL-2 (specific activity; $4000 \text{ cpm}/\text{ng}$) を加え, 室温で 40 分 incubation し, FCS の層の上にのせ 3000 rpm , 3 分間遠心した. 細胞に結合した ^{125}I -IL-2 は, LKB multigamma 1260 gamma counter で測定した. specific binding は, total binding から 500 倍の cold IL-2 存在下での nonspecific binding を差し引いて求めた.

2.8 IL-2R の免疫生化学的解析

2.8.1 細胞表現抗原の ^{125}I 標識及び可溶化

Con A 刺激ラット脾細胞または 6H2-F9 hybridoma を LPO (lactoperoxidase, Sigma) を用いて ^{125}I にて標識した¹⁸⁾. $1 \times 10^8/\text{ml}$ の細胞浮遊液 1 ml に $100 \mu\text{l}$ の LPO ($2 \text{ mg}/\text{ml}$), 1 mCi の ^{125}I , $100 \mu\text{l}$ の 0.03% H_2O_2 を加え反応させた. 反応後, 細胞を PBS で 3 回洗浄し, lysis buffer [0.05 M tris HCl buffer, pH 7.4, 0.14 M NaCl, 0.5% Nonidet P-40 (NP-40), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A, 0.05% sodium azide, $0.2 \text{ TIU}/\text{ml}$ aprotonin, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 20 mM iodoacetamide] を加え, 4°C 1 時間で可溶化した. Lysate は, normal mouse Ig coupled Sepharose-4B を用いて, 非特異的結合物を除去した後 radioimmunoprecipitation に供した.

2.8.2 Radioimmunoprecipitation 及び SDS-PAGE

吸収した Lysate は, ART-18 coupled Sepharose 4B と 4°C 16 時間反応させ, washing buffer (0.05 M Tris HCl, pH 7.4, 0.14 M NaCl, 0.1% NP-40) で 3 回洗浄した. 洗浄後 SDS-PAGE sample buffer (0.1% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 62.5 mM Tris HCl, pH 7.0) を加え 100°C 5 分間で細胞膜抗原を抽出した. SDS-PAGE は, 10% polyacrylamide, 0.1% SDS の条件でスラブゲル電気泳動槽 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) を用いて行った. 分子量マーカーとして phosphorylase b (M. W. 94 kd), bovine serum albumin (67 kd), ovalbumin (43 kd), carbonic anhydrase (30 kd), trypsin inhibitor (20 k), α -lactalbumin (14 kd) の 6 種の混合液 (Pharmacia) を用いた. スラブゲルら, 固定染色, 脱色後 gel slab dryer (Bio-Rad) を用いて乾燥した. 乾燥したスラブゲルは, Cornex Intensifying Screen (Dupont Instruments, Wilmington, DE.) を用い, X 線フィルム (Kodak RP Royal X-Omat) でオートラジオグラフィを行った.

2.8.3 Diagonal gel electrophoresis

IL-2R の解析のため, Hynes らの方法¹⁹⁾ に準じて, 一次元目に非還元下, 二次元目に還元下の条件で行う一次元電気泳動 (Diagonal gel electrophoresis) を行った. 一次元目のゲルを Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, 10% Glycerol, 52% 2-mercaptoethanol, 2.3% SDS) で 37°C 2 時間 incubation し, 還元した. このゲルを二次元目のスラ

ゲルの上におき、泳動を行った。

2・8・4 non-equilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE)

O'Farrell *et al.* の方法²⁰⁾に準じ、一次元目に内径 2.5 mm, 10 cm の cylindrical glass tube を用いて、0.2 M urea, 2% NP-40, 4% acrylamide/bisacrylamide (28.4% acrylamide, 1.6% bisacrylamide), 2% ampholine (pH 3.5-10, LKB) のチューブゲルを作製した。サンプルの上に 50 μ l の overlay solution (9 M urea, 0.8% pH 5-7 と pH 3.5-10 ampholine) を重層し、上部電極槽に陰極用 0.01 M リン酸、下部電極槽に陽極用 0.02 M NaOH を入れ、500V, 2 時間泳動した。泳動後、注意深く tube からゲルを取り出し、Laemmli sample buffer で 37°C 2 時間 incubation し、Diagonal gel electrophoresis と同様に二次元目を泳動した。

2・8・5 IL-2R の neuraminidase 処理

¹²⁵I 標識 cell lysate を 0.2 M sodium acetate buffer, pH 5.0 で透析する。neuraminidase coupled agarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) を phosphate buffer で 3 回洗浄し、0.5 U の neuraminidase に対して 1 ml の lysate を加え、37°C 90 分 incubation した。その後すぐに 1 M Tris で、pH を 8.0 にもどして、immunoprecipitation に供した。

3 成 績

3・1 IL-2R 発現ラット・マウス T 細胞ハイブリドーマの surface marker の解析

Con A blast 脾細胞と BW5147 を細胞融合して得られたクローンは、一次抗体としてラット IL-2R に対する抗体、ART-18 を用いた蛍光抗体法によりクレンジングし、ART-18 陽性 T 細胞ハイブリドーマを選別した。48 クローンのうち、4 つのクローンがラット IL-2R を発現していた。Fig. 1 に示すように、FACS による解析では、4A2-A12 は、39.8% (Fig. 1A), 5B2-E4 は 48.8% (Fig. 1B), 6H2-F9 は 23.0% (Fig. 1C) が ART-18 陽性であった。このうち 6H2-F9 を以下の実験に使用した。6H2-F9 細胞がラットの形質をもちこんでいることを確認するために、ラットの HLA に対する抗体、RT-1 を一次抗体として使用すると、6H2-F9 細胞では、50.1 (Fig. 1D) であるのに対し、BW5147 は検出されなかった (Fig. 1F)。また、BW5147 は、ART-18 では染まらず (Fig. 1E), IL2R は Con A blast 脾細胞からもちこまれた性質であることは明らかである。さらに、6H2-F9 細胞はマウスの IL-2R に対する抗体、

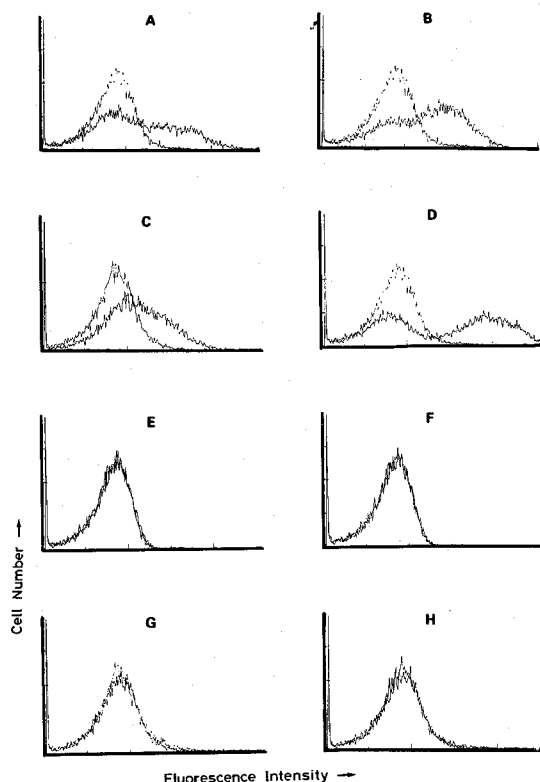


Fig. 1 Cytofluorographic analysis of T cell hybridomas. The data were expressed as a histogram in which the intensity of fluorescence was plotted on an abscissa against the relative number of cells on the ordinate. The IL-2R expression on 4A2-A12 cells (A), 5B2-E4 cells (B), and 6H2-F9 cells (C). The 6H2-F9 cells also express rat homologue of human HLA, RT-1 (D). The BW5147 cells do not express rat IL-2R (E). The BW5147 cells do not express RT-1 (F). The 6H2-F9 cells do not express mouse IL-2R (G) and human IL-2R (H).

AMT-13 やヒトの IL-2R に対する抗体、anti-Tac を用いた蛍光抗体法でマウスの IL-2R, ヒトの IL-2R は検出されず (Fig. 1G, H), ラットの IL-2R だけを発現していた。また、IL-2R 陽性 T 細胞ハイブリドーマの phenotype は、RLy1(-), PLy2(-), W3/25(-) であった。

3・2 T 細胞ハイブリドーマの IL-2R 発現調節機構の解析

3・2・1 IL-2R の up regulation と down regulation

正常活性化 T 細胞が発現している IL-2R は、調節的であり、抗原や mitogen の刺激で出現し、その後、徐々に減少する^{21,22)}。これに対して、adult T cell

leukemia(ATL)細胞や ATL-derived leukemic cell line が発現している IL-2R は構成的であり、抗 Tac 抗体¹⁾で down regulation することはない²³⁾。それゆえ、6H2-F9 が発現している IL-2R が調節的であるかどうかは重要である。Fig. 2 に示すように、6H2-F9 は、通常でも弱く IL-2R を発現している(A: 25.0%)。この 6H2-F9 が発現している IL-2R は、Con A 刺激脾細胞培養上清 (CM) により up regulation される (B: 53.0%)。また、IL-2 吸収 CM やリガンドとしての IL-2 によっても IL-2R の up regulation がみられた。(C: 49.5%, D: 43.8%)。このことは、IL-2R 以外にも CM 中に IL-2R を誘導する物質が含まれていることを示している。

次に、6H2-F9 をラットの IL-2R に対する MoAb, ART-18 存在下で培養した。Fig. 3 に示すように、6H2-F9 が発現している IL-2R は、ART-18 によって down regulation されている (A: 23.0%→B: 10.5%)。さらに、CM で 48 時間培養し up regulation をかけた状態で ART-18 を加えると、down regulation がいっそう明確になった (C: 45.6%→D: 20.0%)。

3・2・2 IL-2R の増殖反応に及ぼす影響

6H2-F9 が発現している IL-2R は正常細胞と同様に

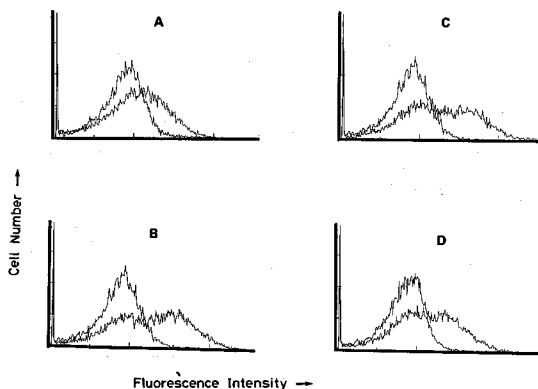


Fig. 2 Up-regulation of rat IL-2R. The 6H2-F9 hybrid cells were cultured for 48 hr in the presence of various CM. After culture, cells were stained with ART-18 and were analyzed by FACS. (A); the expression of IL-2R on 6H2-F9 cells, 25.0%, (B); augmentation of IL-2R expression after incubation with 30% CM, 53.0%. (C); augmentation of IL-2R expression after incubation with IL-2 absorbed 30% CM, 49.5%.

The 30% CM contained 10U IL-2 and IL-2 absorbed CM contained 0.2U IL-2. The unit of IL-2 (U) was calculated as described previously (13). (D); human IL-2 (50U) also augmented the IL-2R expression on 6H2-F9 cells, 43.8%.

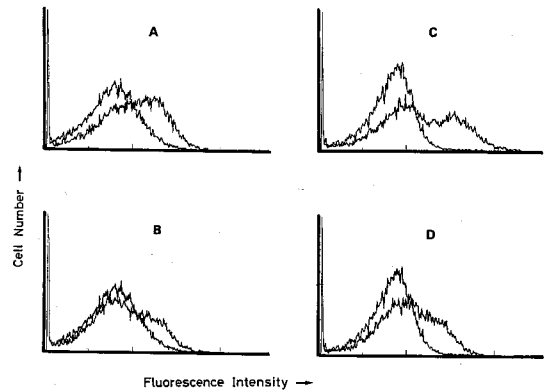


Fig. 3 Down-regulation of IL-2R expressed on 6H2-F9 cells. The 6H2-F9 cells express 23.0% IL-2R (A). 10.5% of 6H2-F9 cells expressed rat IL-2R after incubation with 0.5 ug/ml of ART-18 (B). The 6H2-F9 cells were first precultured for 20 hr with 30% CM. Those cells were further incubated with medium or 0.5 ug/ml of ART-18 for 16 hr. 45.6% of cells expressed IL-2R after incubation with medium (C) and 20.0% of cells expressed IL-2R after incubation with ART-18 (D).

調節的である。この調節的 IL-2R が正常細胞の IL-2R と同様に増殖反応を引き起こすか否かは、重要な問題である。そこで、6H2-F9 及び TART を CM で培養し、その増殖反応に及ぼす影響を検討した。TART²⁴⁾ は、吉木らによって樹立された HTLV-1 で transform したラットのリンパ球由来の細胞株で、ラットの IL-2R の異常発現が認められている²⁵⁾。Table 1 に示すように、6H2-F9 は、CM によって増殖反応を誘導することができた。TART も 6H2-F9 と同様に CM によって増殖反応が誘導された。このことは、IL-2R 陽性 T 細胞ハイ

Table 1 Proliferation of 6H2-F9 and TART by culture with CM.

culture with	³ H TdR uptake (cpm±SEM) ^{a)}	
	6H2-F9 ^{b)}	TART
CM 30%	3132±340	2843±263
CM 15%	2500±348	2650±305
CM 7.5%	2051±251	2250±241
Medium	2034±216	2003±207

a) Values are expressed as mean cpm±SEM of three separate experiments.

b) 6H2-F9 hybrid cells and TART cells were cultured with various percentage of CM for 72 hr in a 96 well plate at a cell density of 1×10^3 /well. The ³H-TdR (1uCi/well) was added and incubated for another 4 hr. The cells were harvested and counted.

ブリドーマが発現している IL-2R は、単に調節的であるばかりでなく増殖に関与していることを示す。

次にリガンドとしての IL-2 による IL-2R 陽性 T 細胞ハイブリドーマの増殖に及ぼす影響について検討した。Table 2 に示すように、3つのクローンにより IL-2 に対する増殖反応に差があり、IL-2 により 4A2-A12 は増殖反応にほとんど影響を受けないが、5B2-E4 は IL-2 により増殖反応の亢進が認められる。また、9D6-E5 は、逆に IL-2 によって増殖反応の抑制が認められた。

このように CM または IL-2 により T 細胞ハイブリドーマの増殖反応に影響が認められることから、IL-2R に対する抗体、ART-18 の増殖反応に及ぼす影響を検討した。Fig. 4 に示すように、5B4-E4 及び 6H2-F9 は、ART-18 によってその増殖反応の抑制が認められるのに対して、IL-2 によって増殖反応に影響を受けない 4A2-A12 は、ART-18 によってもその増殖反応の抑制が認められなかった。

3・2・3 IL-2R 陽性ハイブリドーマの IL-2 産生能 IL-2R 陽性ハイブリドーマの IL-2 産生能について検

Table 2 Proliferation of IL-2R (+) hybridomas in a culture with IL-2.

cells ^{b)}	³ H TdR uptake (cpm±SEM) ^{a)}			
	medium	IL-2		
		0.5	0.25	0.12 (μg/ml)
4A2-A12	11482± 986	11225±1087	11063±1134	11365±1063
5B2-E4	13521±1043	17056±1131	15375±1197	14528±1176
9D6-E5	22504±1576	16594±1287	19205±1723	24760±1879

a) Values are expressed as mean cpm±SEM of three separate experiments.

b) IL-2R(+) hybridoma clones were cultured with various concentrations of IL-2 for 48 hr in a 96 well plate at a cell density of 5×10^3 /well. The ³H-TdR (1μCi/well) was added and incubated for another 4 hr. The cells were harvested and counted.

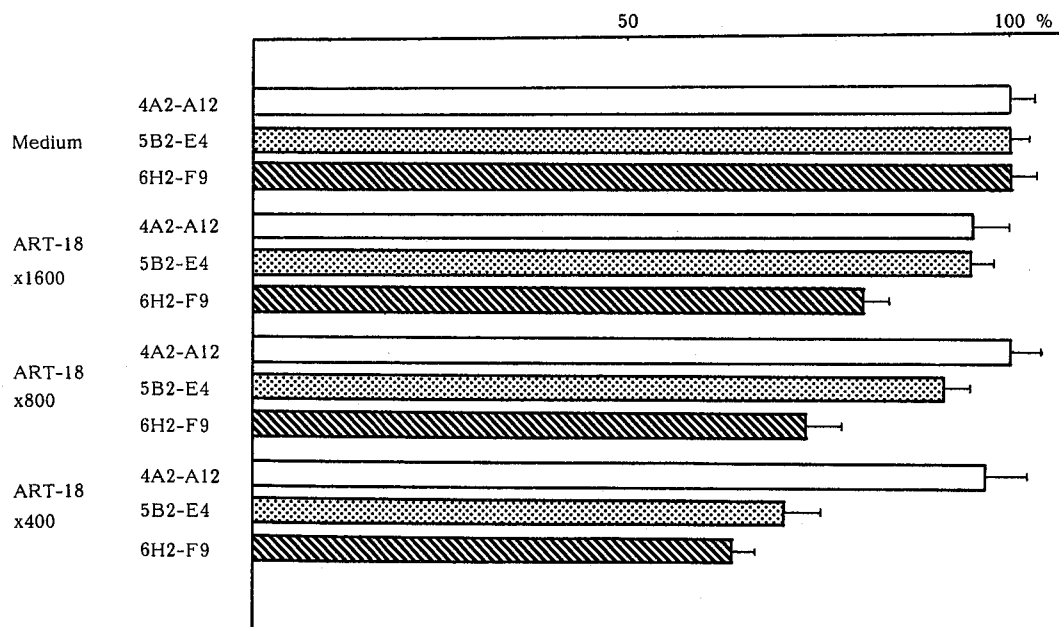


Fig. 4 Effect of ART-18 on the proliferation of IL-2R(+) hybridomas. The proliferation of cells was assessed by uptake of ³H-thymidine. The proliferation of each clones in the absence of ART-18 was expressed as 100%. The proliferation of 5B2-E4 and 6H2-F9 hybrid cells is inhibited by ART-18, whereas the proliferation of 4A2-A12 is not inhibited by ART-18.

Table 3 Production of IL-2 by IL-2R(+) hybridomas.

culture supernatant ^{a)} from	³ H TdR uptake (cpm±CEM)		
	×2	dilution ×4	×8
4A2-A12	5643±545	4262±498	2720±320
5B2-E4	3705±365	3395±361	3150±332
6H2-F9	4405±432	5848±465	3794±387
Medium	414±32		

a) T cell haybridomas were cultured for 48 hr at a cell density of 5×10^4 /ml. Culture supernatants (CS) were recovered. The resulting CS were assessed for their ability to promote the IL-2 dependent cell lines. The ³H-TdR (luCi/well) was added and incubated for another 4 hr. The cells were harvested and counted.

討した。Table 3に示すように3つのクローンは、すべてIL-2を産生していた。しかし、IL-2の産生能とIL-2による増殖反応への影響またはART-18による増殖反応の抑制との間には、有意な関連が認められなかった。

3・2・4 T細胞ハイブリドーマにおけるIL-2Rの親和性

T細胞ハイブリドーマが発現している調節的IL-2RのIL-2に対する親和性を¹²⁵I標識IL-2を用いたbinding assay (Fig. 5A)によって検討した。Fig. 5B

に示すように、scatchard plot analysisでT細胞ハイブリドーマのIL-2Rは、高親和性と低親和性の2種類のIL-2Rを発現していた。高親和性IL-2Rは、解離定数(Kd)が109.6 pMであり、低親和性IL-2Rは、Kdが5.35 nMであった。また、高親和性の maximal binding sitesは 2.9×10^3 であり、低親和性の maximal binding sitesは、 2.2×10^4 であった。このことからT細胞ハイブリドーマが発現しているIL-2R., 高親和性IL-2Rに比べて低親和性IL-2Rを10倍近くもっていることが判明した。

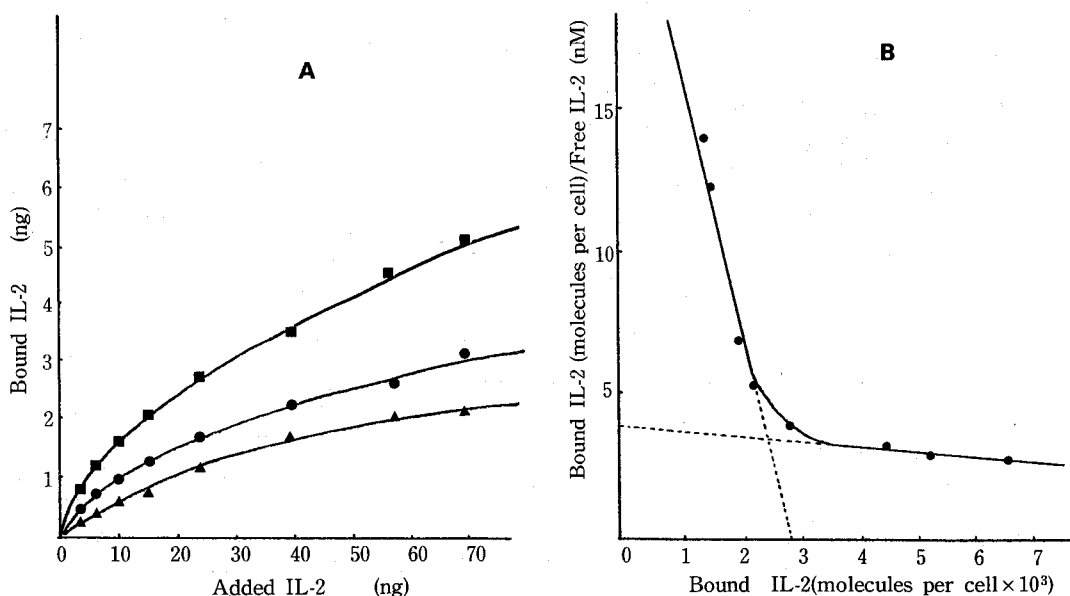


Fig. 5 (A); IL-2 binding assay: Binding curves of ¹²⁵I-labeled IL-2 to IL-2R(+) hybridomas. Total binding of IL-2 (■), specific binding (●), non-specific binding (▲). Scatchard plot is calculated by these curves. (B); Scatchard plot analysis: The dissociation constant (Kd) for receptors with a high affinity is 109.6 pM, the Kd for receptors with a low affinity is 5.35 nM. The number of high receptor sites is 2.9×10^3 per cell, and that of low affinity receptor sites is 2.2×10^4 per cell.

3.2.5 Ca^{++} ionophore と phorbol ester の IL-2R 発現及び IL-2 産生能に与える影響

細胞内 Ca^{++} 受容蛋白質を活性化する Ca^{++} ionophore A23187 (Sigma) と発癌プロモーターである phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) が 6H2-F9 の IL-2R に及ぼす影響について検討した。クロトン油から単離された phorbol ester の中で最も強力な発癌プロモーターの一つである TPA は、発癌過程を促進するだけでなく細胞の分裂や分化の修飾、酵素の誘導、核酸や脂質の代謝亢進、放出反応の惹起など多彩な生物活性をもつことが示されている²⁶⁾。Table 4 に示すように、6H2-F9 の IL-2R の発現に影響を与えない濃度の TPA と Ca^{++} ionophore の相乗効果を検討した。TPA 3.4 nM と Ca^{++} ionophore 2 μM の両方を作用させたとき、6H2-F9 の IL-2R の発現が最も増強された (Fig. 6, A : 23.6% → B : 34.2%)。これに対して TPA や Ca^{++} ionophore 単独では IL-2R の発現増強は認められなかった (Fig. 6, C : 23.8%, D : 19.3%)。さらに、TPA と Ca^{++} ionophore の両方を作用させたとき、通常の volume pattern (Fig. 6, E) と比較して、全体的に大きな細胞が増加していることが明らかになった (Fig. 6, F)。これは、TPA と Ca^{++} ionophore により 6H2-F9 が活性化していることを示す。これに対して、TPA または Ca^{++} ionophore 単独では細胞の増大は認められなかった (Fig. 6, G, H)。また、TPA と Ca^{++} ionophore によって誘導される IL-2R は、scatchard plot analysis で高親和性と低親和性の両方の IL-2R が同じように誘導されていた。次に TPA と Ca^{++} ionophore が T 細胞ハイブリドーマの IL-2 産生能に与える影響について検討した。Table 5 に示すように 4A2-A12 には TPA と Ca^{++} ionophore により IL-2 産生に影響を与えないが、5B2-

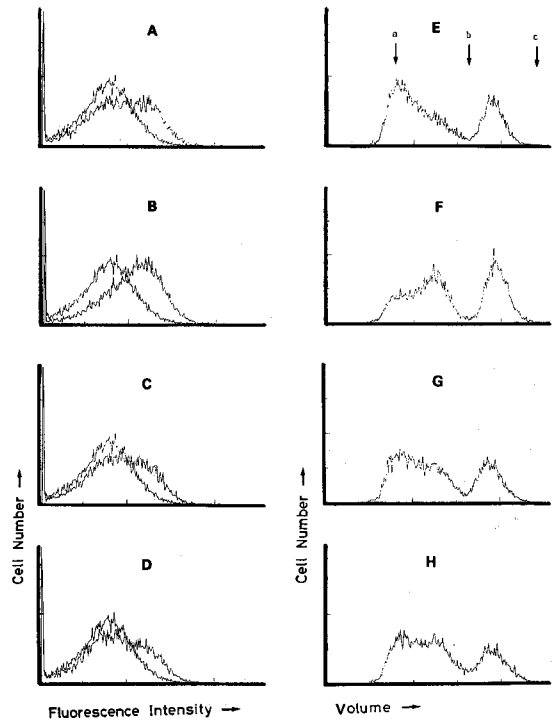


Fig. 6 Up-regulation of IL-2R by Ca^{++} ionophore, A23187 and TPA. The 6H2-F9 cells were cultured for 3 hr at 37°C with various concentrations of Ca^{++} ionophores, or/and TPA. After cells were replaced with fresh complete medium and incubated for 48 hr. Those cells were stained with ART-18 and were analyzed by FACS. Cell size calculation was performed by using latex beads, 5.0, 10.0, or 20.0 μm in diameter (Latex Microspheres; Epics division of Coulter Corp., Hialeah, Florida).

Table 4 Effect of TPA and Ca^{++} ionophore on IL-2R expression by IL-2R(+) hybridomas^{a)}.

TPA (nM)	IL-2R(+) cells (%)		
	Ca^{++} ionophore (μM)		
	2	1	0
6.8	32.15	29.64	24.89
3.4	34.16	31.58	23.77
1.7	23.54	24.64	20.09
0	19.32	18.30	23.62

a) 6H2-F9 cells were incubated with TPA and/or Ca^{++} ionophore for 3 hr at 37°C. After cells were washed, they were replaced with fresh complete medium and incubated for 48 hr. Cells were recovered and stained with ART-18 for 30 min. After washing, cells were then stained with FITC-goat-anti-mouse Ig for an additional 45 min. After washing, the percentage of IL-2R(+) cells were determined by FACS analysis.

Table 5 Effect of TPA and Ca^{++} ionophore on IL-2 production by IL-2R(+) hybridomas.

culture supernatant ^{a)} from		³ H TdR uptake (cpm \pm SEM)		
		$\times 2$	dilution $\times 4$	$\times 8$
4A2-A12	Medium	2245 \pm 197	1520 \pm 128	1391 \pm 115
	TPA+ Ca^{++}	2124 \pm 194	1713 \pm 143	1188 \pm 103
5B2-E4	Medium	1275 \pm 118	1122 \pm 101	1010 \pm 96
	TPA+ Ca^{++}	1478 \pm 127	1461 \pm 118	1278 \pm 112
6H2-F9	Medium	1767 \pm 142	1707 \pm 148	1414 \pm 108
	TPA+ Ca^{++}	3102 \pm 206	1467 \pm 127	1301 \pm 123

a) IL-2R(+) T hybridomas were incubated with or without 3.4 nM TPA and 2 μM Ca^{++} ionophores for 3 hr at 37°C. After washing of cells, cells were resuspended in fresh complete medium. They were incubated for another 48 hr. The ³H-TdR (luCi/well) was added and incubated for another 4 hr. The cells were harvested and counted.

E4 及び 6H2-F9 では, TPA と Ca^{++} ionophore により IL-2 産生が増加した。

3.3 6H2-F9 における IL-2R の免疫生化学的解析

3.3.1 ラット IL-2R の SDS-PAGE

¹²⁵I 細胞表面抗原を標識した 6H2-F9 を lysing buffer で可溶化し, 還元下及び非還元下の条件で SDS-PAGE を行い, Con A 刺激正常ラット T 細胞が発現している IL-2R との比較を行った。正常 T 細胞からの IL-2R は, 非還元で 72-77 kd と 40-48 kd の 2 つの component から成っていた (Fig. 7, lane A)。これに対して 6H2-F9 からの IL-2R は, 非還元下で 110 kd, 72-77 kd, 45-48 kd の 3 つの component が認められた (Fig. 7, lane C)。また, 還元下の条件で, 正常 T 細胞の IL-2R は, 50-56 kd の major component と 35-38 kd の minor component から成っていた (Fig. 7, lane B)。これに対して 6H2-F9 の IL-2R は, 110 kd, 72-77 kd, 50-52 kd, 35-38 kd から成っていた (Fig. 7, lane D)。さらに, 6H2-F9 は, 約 40 kd の aberrant IL-2R をもっていた。

3.3.2 Diagonal Gel electrophoresis による IL-2R の解析

次に, 非還元下及び還元下の IL-2R の component の関係を明確にするために, didgonal two dimensional electrophoresis を行った。Con A 刺激正常活性化 T 細胞の IL-2R の major component は, 40-48 kd が還元下で 50-56 kd と分子量が増加しており, 還元下の 35-38 kd の minor component は, 非還元下の major component から由来していることが明らかとなった (Fig. 8A)。また, 6H2-F9 からの IL-2R の 110 kd の

component は, 還元下でもほとんど分子量は, 変化せず, 還元下の minor component は, やはり major component から由来していた。また, aberrant IL-2R からも還元下で minor component が認められた。

3.3.3 NEPHGE による IL-2R の解析

さらに生化学的性状を明らかにするために, non-equilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) を行った。Fig. 9 に示すように, Con A 刺激正常 T 細胞からの IL-2R は, pI に heterogeneity を認め, pI 5.0~5.6 と pI 6.0~6.4 の 2 つの

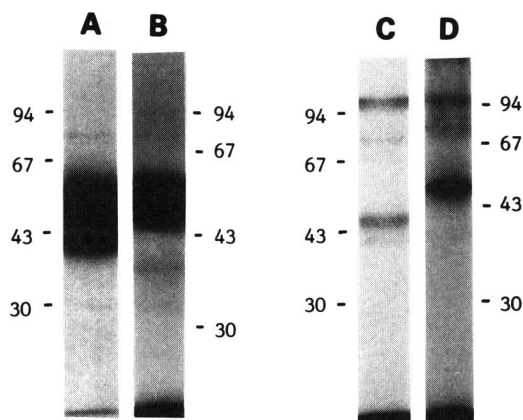


Fig. 7 Autoradiogram of SDS-PAGE of the rat IL-2 receptors. Extracts from ¹²⁵I-surface labeled rat Con A activated T cells (lane A and B) and 6H2-F9 cells (lane C and D) were immunoprecipitated with ART-18 coupled to Sepharose-4B. Bound materials were eluted with SDS-PAGE sample buffer and analyzed by SDS-PAGE under non-reducing (lane A and C) or reducing (lane B and D) conditions.

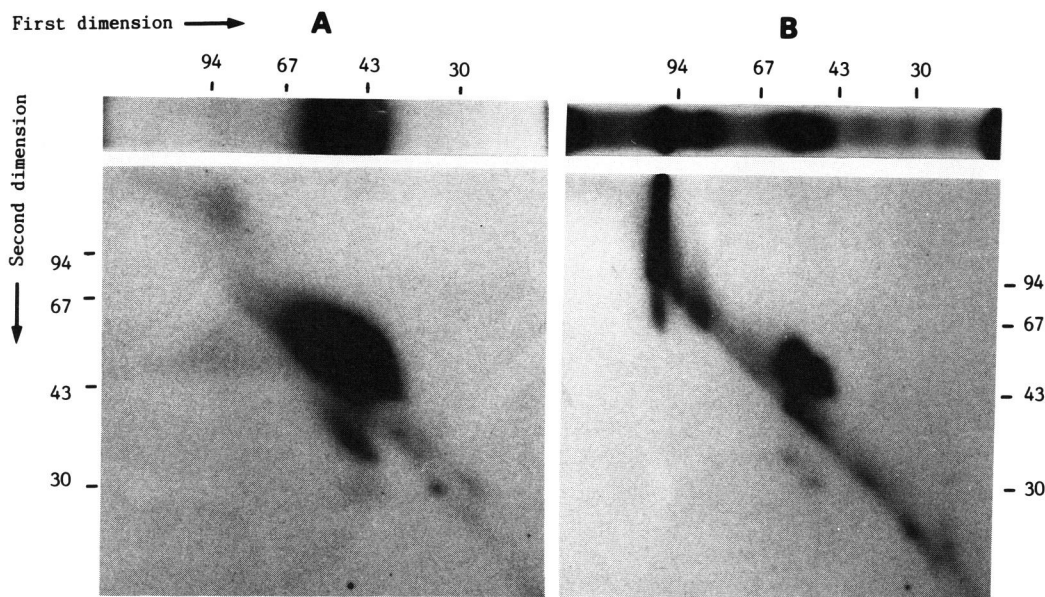


Fig. 8 Diagonal two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of rat IL-2R. Rat IL-2R obtained from rat Con A activated T cells (A) and 6H2-F9 cells (B) were analyzed by two dimensional diagonal gels using non-reducing condition in the first dimension (left to right) and reducing condition in the second dimension (top to bottom).

componentを認めた。このうちacidic componentは、basic componentと比較して、M. W. が2~3 kd高くなっていた(Fig. 9, A)。これに比較して6H2-F9からのIL-2Rは、pIにおけるheterogeneityが少なくpI 6.0~6.4のbasic componentだけが認められた。aberrant IL-2Rは、pI 5.8~6.2とややacidic側にあった(Fig. 9, B)。

3.3.4 Neuraminidase 処理による IL-2R の解析

¹²⁵I 標識 IL-2R を前述のようにneuraminidaseで処理後NEPHGEによる解析を行った。Fig. 10に示すように、Con A 刺激正常T細胞からのIL-2Rは、acidic componentのradioactivityが減少し、basic componentが増加しており、完全にではないがneuraminidase処理によりacidic componentがbasic componentへ移行することを示している。また、Fig. 9Aで認められたacidic componentとbasic componentのM. W. の差が消失していた(Fig. 10, A)。これに対して、6H2-F9からのIL-2Rは、neuraminidase処理でも、そのpIとM. W. の変化は認められなかった。これは、6H2-F9のIL-2Rは、シアル酸の添加を受けていないことを示す。

4 考 察

4.1 IL-2-IL-2R システムの意義

最近、Uchiyama *et al.*¹⁾がATL細胞及びその関連細胞株にTac抗原の異常発現を発見してから、IL-2Rと発癌の関係が注目されるようになった。さらに、一部の増殖因子または、増殖因子レセプターが発癌遺伝子産物であることが報告された。Waterfield *et al.*²⁷⁾とPoolitte *et al.*²⁸⁾は、サル肉腫ウィルス(simian sarcoma virus: SSV)の発癌遺伝子v-sisの産物が分子量28,000のタンパク質(p28^{sis})と同定し、そのアミノ酸配列からPDGF(platelet-derived growth factor)ときわめて類似したアミノ酸配列を示すことを報告した。さらに、Robbins *et al.*²⁹⁾は、p28^{sis}がダイマー形成、プロテアーゼによる開裂など一連のプロセッシングを経て、構造的にも免疫学的にも活性PDGFに似た分子に変換することを示した。一方、トリ赤芽球症ウィルス(avian erythroblastosis virus: AEV)の発癌遺伝子erb Bの塩基配列から推定したアミノ酸配列が、ヒトのEGF(epidermal growth factor)レセプターのアミノ酸配列はほとんど同じであることが報告され^{30,31)}、増殖因子とそのレセプターが発癌遺伝子に深く関係していることが注目をあびている。したがっ

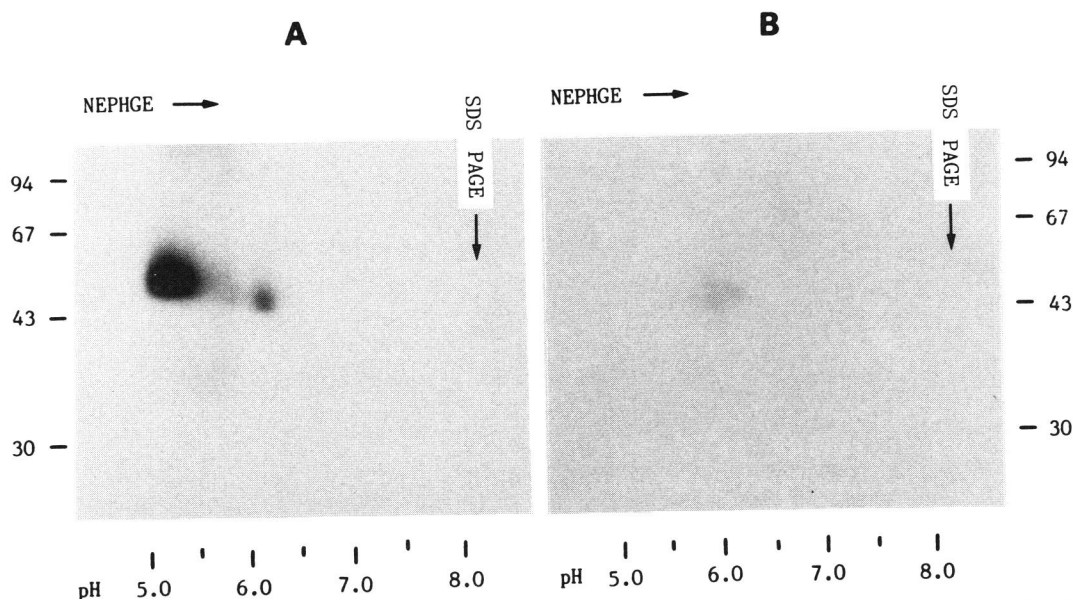


Fig. 9 Non-equilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) and SDS-PAGE analysis of rat IL-2R. Rat IL-2R derived from rat Con A activated T cells (A) and 6H2-F9 cells (B) were analyzed by non-equilibrium pH gel electrophoresis (horizontal; left to right) followed by SDS-PAGE (vertical; top to bottom).

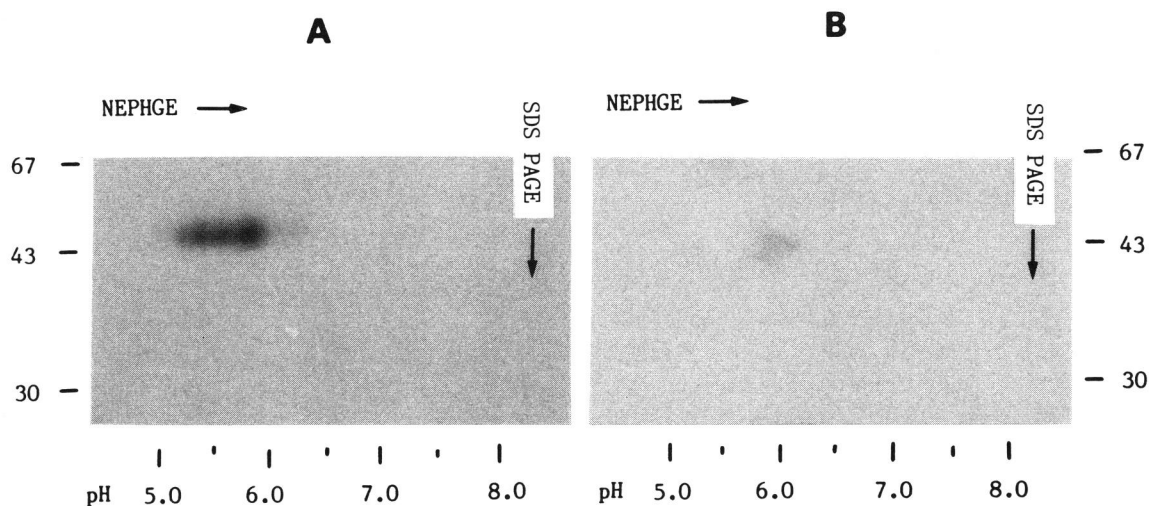


Fig. 10 Neuraminidase treatment of rat IL-2R. Rat Con A activated T cells (A) and 6H2-F9 cells (B) were labeled and lysed. Before the immunoprecipitation of IL-2R, the cell lysate was treated with neuraminidase. Neuraminidase treated materials were purified by ART-18-coupled Sepharose-4B and were analyzed with NEPHGE followed by SDS-PAGE.

て、増殖因子とそのレセプターの解析は、細胞の増殖機構ばかりでなく、細胞の transformation ひいては癌化の機構を解析するうえでも重要である。

IL-2 は、選択的に T 細胞増殖を促進する因子 TCGF (T cell growth factor) として Morgan *et al.* により発見された³²⁾。その後、Gillis *et al.* は、IL-2 が

CTL (cytotoxic T lymphocyte) の増殖分化に重要な役割を有することを明らかにし、IL-2 の生物学的、生化学的解析を進めた^{33,34)}。CTL 前駆細胞は、抗原提示細胞から抗原と class I MHC 分子の呈示を受け、IL-2R を発現し、primed CTL 前駆細胞となる。一方、抗原提示細胞から抗原と Ia 分子の呈示を受け IL-1 に

感受性をもつようになったヘルパー前駆細胞は、M ϕ (Macrophage)の産生するIL-1の刺激によりIL-2を産生するようになる。ヘルパーT細胞の産生したIL-2がCTL前駆細胞が発現しているIL-2Rに結合することによりCTL前駆細胞はクローナルな増殖をおこし、CTLへ分化していく。その他、IL-2は、T細胞の増殖以外にもLAK (lymphokine-activated killer cells)の誘導やNK細胞 (natural killer cell)の増殖、さらにB細胞の増殖にも関与していることが明らかにされている³⁵⁻³⁷⁾。

一方、IL-2Rは、Smith *et al.* がアイソトープで標識したIL-2を用いて行った実験から、活性化T細胞には、IL-2特異的な都合部位、すなわちレセプターが存在し、IL-2とそのレセプターは、ホルモンとそのレセプターと同様な関係にあることが報告された²¹⁾。これによってIL-2は、リガンドとしてIL-2Rに結合することにより、細胞増殖をひきおこすことが明らかになった。また、IL-2Rは、T細胞のみならず、NK細胞やB細胞にも発現しており^{35,36,38)}、IL-2-IL-2R系は、広く免疫応答に関与していることが示されている。

4.2 IL-2R 発現調節機構

4.2.1 IL-2Rの発現

正常のIL-2Rは、T細胞が抗原やレクチンで刺激されたとき、その細胞表面に出現し^{21,22)}、その発現は、種々の因子によって調節を受けている。また、特異抗原に対するT細胞レセプターに密接に関連しているT3抗原に対する刺激によってもIL-2Rの発現が認められる²⁹⁾。しかも、その発現は一時的であり、このような刺激がなくなれば、その後徐々にそのレセプター数は減少していく。このような正常細胞における調節的IL-2Rの発現のほかに、構成的なIL-2Rの発現が、HTLV-1陽性細胞であるATL (adult T cell leukemia)細胞及びその細胞株であるMT-1、Hut 102などに認められる^{23,40)}。これらの細胞株に発現されているIL-2Rは、正常活性化T細胞のIL-2Rと異なり、抗Tac抗体^{1,41)}でその発現がdown regulationされることはなく、IL-2Rの数は、正常活性化T細胞に比べはるかに多いことが示されている²³⁾。さらに、IL-2に対する細胞増殖反応でもPHA刺激T細胞ではIL-2を加えることにより³H-TdRの取り込みが増加するのに対してATL細胞では認められない。このことは、ATL細胞が発現しているIL-2Rは、構成的なものであり機能的なものではないことを示している。このようなIL-2Rの異常発現が細胞の癌化とどのような関連にあるのか非常に興味深い課題である。最近、Yodoi *et al.* は、吉木らが樹立

したHTLV-1でトランスフォームしたラットのリンパ球由来の細胞株(TARS-1, TARL-2, TART-1)²⁴⁾にもIL-2Rの発現異常が認められるが、これらラット由来の細胞株に発現しているIL-2Rは、ラット固有のIL-2Rであること、ATL細胞及びTARS-1細胞に発現しているIL-2Rは、正常細胞とはほとんど相異がないことを報告している²⁵⁾。このことは、HTLV-1感染に伴ってラットの細胞株にヒトIL-2R遺伝子がもち込まれるのではなく、ラットの正常IL-2R遺伝子が活性化された結果であると考えられる。したがって、HTLV-1感染がIL-2R発現調節機構に直接的あるいは間接的に関与していることは明らかであるが、IL-2R発現調節機構がどのようにリンパ球の異常増殖、すなわちT細胞の白血病化と関係しているかの解明は、今後の問題と考えられる。

4.2.2 IL-2R 発現調節因子

ホルモンなどでは、リガンド自身によるレセプターの発現調節が知られているが⁴²⁾、最近IL-2Rに関して、Reem *et al.* は、Con AやPMA (phorbol myristate acetate)によって活性化したT細胞を用いて、IL-2によるIL-2Rのup regulationを報告している⁴³⁾。著者らは、IL-2Rの調節機構をクローンレベルで解明するために、IL-2R陽性T細胞ハイブリドーマを確立した。このハイブリドーマは、通常でも弱くIL-2Rを発現しているがラットのIL-2Rに対する抗体、ART-18によりdown regulationが認められたことから、調節的IL-2Rを発現していると考えられた。そこで著者らは、このハイブリドーマを用いて、IL-2R発現の促進因子について検討した。ハイブリドーマのIL-2Rは、リガンドとしてのIL-2によってup regulationされ、クローンレベルでもIL-2によるIL-2R発現促進が認められた。さらに、CMだけでなくIL-2を吸収したCMによってもIL-2Rの発現促進が認められ、IL-2以外にもCM中にIL-2R発現促進因子が存在することが明らかになった。

IL-2R発現促進因子としてIL-2R-inducing factor^{44,45)}TCF1 (T cell cytotoxicity inducing factor 1)⁴⁶⁾などが報告されているが、最近、Teshigawara *et al.* は、HTLV感染T細胞がIL-2活性のないIL-2R誘導因子を産生していることを報告し、ADF (ATL-derived factor)と命名している⁴⁷⁾。ADFは、helper/inducer phenotypeをもつT細胞株から産生されており、調節的IL-2Rを発現しているNK様細胞株、YT細胞⁴⁸⁾のIL-2Rを顕著に誘導する。さらに、このYT細胞には、高親和性IL-2Rと低親和性IL-2Rが存在

しており, ADF によって誘導されるのは高親和性 IL-2R であることが報告されている⁴⁹⁾. EGF やインスリンなどのホルモンレセプターでは, 高親和性と低親和性のものが存在することは良く知られているが, 正常活性化 T 細胞にも高親和性と低親和性の IL-2R が存在する³⁵⁾. 正常活性化 T 細胞の高親和性 IL-2R は, IL-2 によって down regulation され⁵⁰⁾, IL-2 によって誘導される IL-2R は, 高親和性よりも低親和性 IL-2R が多いことが報告されている⁵¹⁾. このことは, IL-2 によって細胞内伝達に関与するのは, 高親和性 IL-2R であり, 高親和性 IL-2R に IL-2 が結合することにより, 増殖反応が惹起されると考えられる. また, 正常活性化 T 細胞では, IL-2 によって低親和性 IL-2R が多く誘導されるため, IL-2 に対する反応性が低下し, ついには IL-2R の発現も減少し, 増殖反応も低下してくるものと考えられる.

このように低親和性 IL-2R を高親和性 IL-2R に変化させる因子の存在が考えられ, IL-2 以外の因子による高親和性, 機能的 IL-2R の発現調節機構の解明が今後の課題と考えられる.

4・2・3 IL-2R の機能

IL-2R を発現した正常活性化 T 細胞は, IL-2 のレセプターへの結合によってクローナルな増殖反応を起こす. これに対して構成的レセプターを発現している ATL 細胞では, IL-2 によって増殖反応への影響が認められない. このことは, IL-2R の発現調節機構が密接に IL-2R の機能に関係していると考えられる. Gill *et al.*⁵²⁾ は, EGF レセプターをもつ human epidermoid carcinoma, A431 において, 高濃度の EGF はかえって A431 の細胞増殖を抑制することを報告し, 細胞増殖に働く刺激は, ある条件下では, 抑制にも関与していると述べている. そして, このような増殖の抑制は, receptor-associated tyrosine kinase の overstimulation による可能性が考えられている⁵³⁾.

また, 最近, 高濃度の IL-2 が HTLV 感染 T 細胞クローンのいくつかの増殖を抑制することが報告されている⁵⁴⁾. Hatakeyama *et al.*⁵⁵⁾ は, human IL-2R cDNA を mouse T-lymphocytic line, EL-4 に transfection して確立した高親和性と低親和性 IL-2R を発現している ELT-5, ELT-13 を用いて IL-2 に対する増殖反応について検討し, 高濃度の IL-2 は, 増殖抑制に働くことを報告している. しかし, これらの実験に用いられている細胞は, 腫瘍細胞であり, そのレセプターは, 調節的なものではなく, その数は, 正常細胞に比較してはるかに多く発現されている. すなわち,

異常発現された構成的レセプターとリガンドとの増殖反応における影響を検討している.

著者らは, このような構成的なレセプターとリガンドの相互作用における増殖反応ではなく, 調節的レセプターにおけるリガンドとの相互作用による増殖反応について検討した. T 細胞ハイブリドーマにおける三つのクローンのうち ART-18 によって増殖反応の抑制が認められた二つのクローンは, IL-2 によって増殖反応への影響が認められた. しかも, IL-2 による増殖反応は, クローンによって差が認められ, 増殖の亢進するものと抑制するものがあつた. このことから, 調節的 IL-2R において, IL-2-IL-2R の相互作用は, 増殖反応において亢進と抑制という両方の作用に関与していることが明らかになった.

4・3 T 細胞活性化機構の解析

T 細胞活性化の初期の段階で two signal hypothesis が提唱されている⁵⁶⁾. すなわち, T 細胞抗原レセプターに抗原が結合することによって細胞質内の free Ca^{++} の濃度が増加するが, 第二のシグナルがなければ T 細胞を活性化するには不十分である. TPA は, protein kinase C を活性化することにより第二のシグナルとして働き T 細胞を活性化する. 著者らは, IL-2 の産生及び IL-2R の発現誘導において protein kinase C の活性化と細胞内 Ca^{++} の動員が必要であることを明らかにするため, TPA と Ca^{++} ionophore を用いて実験を行った. TPA は, 細胞に作用すると細胞膜に嵌入して Ca^{++} とセリンリン脂質の存在下に protein kinase C と結合し, イノシトールリン脂質の代謝回転によって産生されるジグリセリドが細胞内伝達物質として protein kinase C を活性化する⁵⁷⁾ のと同様の作用機構で protein kinase C を活性化する⁵⁸⁻⁶⁰⁾. T 細胞ハイブリドーマで, 単独では, IL-2R の発現に影響を与えない量の TPA と Ca^{++} ionophore を用いて, IL-2R の発現誘導を検討した. その結果, TPA と Ca^{++} ionophore の両方を作用させることにより, 単独では IL-2R の発現誘導されない量で, 相乗効果によって IL-2R の発現誘導が認められた. また, このようにして誘導された IL-2R は, scatchard plot analysis で高親和性及び低親和性の両方であることが明らかとなった. さらに, TPA と Ca^{++} ionophore の両方を作用させることによって T 細胞ハイブリドーマの volume が大きくなり, 活性化していることが示された. また, TPA と Ca^{++} ionophore を作用させることにより, T 細胞ハイブリドーマの IL-2 産生も増加している. 以上により, IL-2R の発現誘導及び IL-2 産生は, Ca^{++} イオンの存在

下で protein kinase C が活性化されることによって起こることが明らかとなった。著者らの結果は、TPA と Ca^{++} ionophore が antigen dependent activation step において synergistic action をおこすという Weiss *et al.* の結果と一致する^{61,62}。彼らは、human T cell line, Jurkat を使用して、human T cell receptor と関連した T3 molecule に対する MoAb は、cytoplasmic Ca 濃度を増加させるが、TPA が存在しなければ、IL-2 の産生や IL-2 specific mRNA の合成には十分でないことを示している。また、Albert *et al.*^{56,63} は、long-term-alloreactive な $\text{Lyt}2^+$ cytotoxic T 細胞クローンと $\text{T}4^+$ helper T 細胞クローンを用いて、TPA と Ca^{++} ionophore の IL-2R 発現に及ぼす影響について検討している。この二つのクローンは、specific alloantigen 非存在下で、TPA と Ca^{++} ionophore により、両方とも IL-2R の発現誘導が認められるが、 $\text{T}4^+$ クローンでは、IL-2 の産生も認められ外来の IL-2 を加えることなく、増殖反応が認められる。これに対して $\text{Lyt}2^+$ クローンは、外来の IL-2 がなければ増殖反応は起こらない。これらの結果から、彼らは T 細胞クローンで Ca^{++} 依存の protein kinase C の活性化は、antigen receptor triggering events でおきかえることができるが、IL-2R の IL-2 dependent triggering におきかえることはできないと結論している。著者らは、IL-2R 陽性 T 細胞ハイブリドーマにおいて TPA と Ca^{++} ionophore 処理後の増殖反応について検討してみた。T 細胞ハイブリドーマは、IL-2 も産生しており、Albert *et al.* の helper T 細胞クローン相当すると考えられ、自らの IL-2 によって増殖反応の亢進が認められることが予測されたが、medium コントロールに比較して有意な増殖反応の亢進は認められなかった。

4.4 ラット IL-2R の構造

1981 年ヒト IL-2R を認識する抗 Tac モノクローナル抗体が Uchiyama *et al.*¹¹ によって作製されてからラット及びマウスの IL-2R に対するモノクローナル抗体の開発が進められた^{5,7}。これらの抗体を用いて IL-2R の生化学的性状及び発現調節機構の解明が著しく進歩した。最近、抗 Tac 抗体アフィニティカラムを用いてヒト IL-2R を分離精製することにより、Uchiyama *et al.*⁶⁴ と Greene *et al.*⁶⁵ が同時に IL-2R の cDNA のクローニングに成功した。Uchiyama *et al.* は、ATL 由来 MT-1 細胞より、Green *et al.* は、Hut 102 より Tac 抗原を精製しているが、IL2RcDNA より得られたアミノ酸配列は、同じものであった。このようにヒト IL-2R に関しては、かなりのところまで研究が進んで

いるが、まだすべてが明らかにされたわけではない。

ラットの IL-2R に関しては、1983 年に Osawa *et al.*⁶ によってラット IL-2R に対するモノクローナル抗体、ART-18 が作製されたが、その生化学的性状は、いまだ十分に解明されていない。Osawa *et al.*⁶⁶ は、¹²⁵I で Con A 刺激 Lewis ラット脾細胞の細胞表面抗原を標識し、ラット IL-2R は、非還元下で 40-48 kd の major component と 72-77 kd の minor component、還元下で 50-56 kd の major component と 35-38 kd の minor component が存在することを報告している。著者らもこれらの追試を行っているが、同様の結果を得ている。さらに、彼らは、非還元下の 72-77 kd の minor component は、還元下の 35-38 kd の minor component が S-S 結合した dimer であると結論している。著者らは、この点を明らかにする目的で diagonal electrophoresis を行ったところ、還元下の 35-38 kd の minor component は、非還元下の minor component から由来するのではなく、40-48 kd の major component から由来していることが明らかとなった。さらに、NEPHGE による解析から 50-56 kd の major component は、pI 5.0-5.6 の acidic component と pI 6.0-6.4 の basic component から成り立っており、acidic component は、basic component より 2-3 kd 重いことを明らかにした。このような pI の heterogeneity は、ヒト IL-2R に関する Wano *et al.*⁶⁷ の報告と共通する結果である。すなわち、彼らは、MT-1 細胞の Tac 抗原を ³⁵S-methionine で標識後 IEF (isoelectric focusing) により解析しており、ヒト IL-2R の 60-65 kd の major component は、pI 4.2-4.7 と pI 6.2 の二つの component から成り立っており、acidic component は、2-3 kd 重いことを述べている。これらの結果は、ヒトとラットの相同性を表すものである。

さらに、著者らは、ラット IL-2R を neuraminidase 処理後 NAPHGE による解析を行った。ラット IL-2R は、neuraminidase 処理により acidic component が消失し、完全にはないが basic 側に移行し分子量が 2-3 kd 小さくなっている。このことから、ラット IL-2R は pI 6.0-6.4 の basic component にシアル酸が添加されることにより pI が大きく酸性側に変化し、分子量が 2~3 kd 上昇することが明らかになった。

IL-2R 陽性 T 細胞ハイブリドーマの IL-2R の解析で、正常活性化 T 細胞にはない約 110 kd の component が出現している。この component は、非還元下及

び還元下でその分子量はほとんど変化なくラット IL-2R の third component と考えられる。また、T 細胞ハイブリドーマの IL-2R は、NEPHAGE による解析で pI 6.0-6.4 の basic component のみで acidic component はなかった。さらに、T 細胞ハイブリドーマには、aberrant IL-2R が存在していた。ヒトの系で HTLV 陽性白血病細胞株 Hut 102 の IL-2R の解析で、正常 IL-2R のほかに aberrant IL-2R が存在しているが他の HTLV 陽性細胞である MT-1 や ATL-6 の IL-2R は、正常であることが報告されている⁶⁷⁾。著者らが作製したラットマウス T 細胞ハイブリドーマにも aberrant IL-2R が存在することから、このような aberrant IL-2R は、細胞の癌化に伴って出現するものではないと考えられる。

4-5 IL-2R 関連抗原とリン酸化

著者らは、T 細胞活性化の初期段階における IL-2R 発現の際 protein kinase C が関与することを明らかにした。さらに、IL-2 が IL-2R に結合した時、増殖反応の亢進と抑制の両面の作用をすることを明らかにした。しかし、IL-2R に IL-2 が結合した後の細胞内メカニズムに関しては、ほとんど知られていない。最近、IL-2 によって IL-2R がリン酸化されることが報告されているが、そのリン酸化がどのように T 細胞増殖に関与しているかは、不明な点が多い。

EGF やインシュリンのレセプターは、リガンドが結合することによりリン酸化をきたす^{68,69)}。このようなリン酸化は、チロシン特異的であり、レセプター自身がチロシン特異的キナーゼ活性を持ち、自己リン酸化が認められる⁷⁰⁾。EGF レセプターの細胞質側は、EGF 依存的にチロシンをリン酸化するチロシンキナーゼドメインとこのキナーゼにより自己リン酸化を受ける部分から成る。EGF がチロシン残基を自己リン酸化することは、レセプターのチロシンキナーゼ活性を上昇させ、リン酸化の促進がおきる。

一方、TPA で細胞を処理すると、protein kinase C の活性化により EGF レセプターの細胞膜下のスレオニンがリン酸化され、EGF 結合量が減少することが報告されている⁷¹⁾。しかも、リン酸化の結果、レセプターの EGF に対する親和性が低下し、EGF によるチロシンキナーゼの活性化が抑制される。このことから、EGF に対する親和性がレセプターのリン酸化に帰結できる可能性がある。すなわち、チロシンのリン酸化は促進、スレオニン（あるいはセリン）のリン酸化は阻害というメカニズムである。

IL-2R についてはどうであろうか。IL-2R のアミノ

酸解析では、IL-2R にチロシンキナーゼドメインは存在しない。しかし、phorbol ester 刺激による IL-2R のリン酸化は認められている⁷²⁾。このことから、リンパ球は、他の細胞より分化したため protein kinase C で活性化する部分は存在するがチロシンキナーゼに相当する部分と、チロシンキナーゼでリン酸化を受ける部分が分離してしまった可能性がある。近年、著者らは、5C6-F4 という early activation antigen を発見した。この抗原は、IL-2R と密接に関連しており⁷³⁾、IL-2 によりリン酸化を受け、さらに IL-2R の affinity を制御していることを見出している。

今後、この調節的 IL-2R 発現 T 細胞ハイブリドーマを用いて IL-2R と 5C6-F4 抗原の関係をさらに検討していきたい。

5 結 論

調節的ラット IL2R 発現 T 細胞ハイブリドーマを確立し、その調節機構及び機能を解析し、ラット IL2R の構造を明らかにした。

1) T 細胞ハイブリドーマの IL2R は、ラット IL2R に対する MoAb で down regulation され、CM 及びリガンドとしての IL2 によって up regulation された。Scatchard plot analysis によってこのような IL2R は、高親和性と低親和性のレセプターから成ることを明らかにした。

2) T 細胞ハイブリドーマは、調節的 IL2R を有しているだけでなく、IL2 の産生も認められ、正常活性化 T 細胞において、autocrine の機構が存在することが示唆された。

3) T 細胞活性化の初期における IL2R の発現及び IL2 の産生に関する細胞内伝達機構として Ca^{++} イオン存在下で protein kinase C が活性化することが必要であることを明らかにした。

4) 調節的 IL2R を有した T 細胞ハイブリドーマにおいて IL2 と IL2R の相互作用によって、必ずしも増殖反応の亢進だけでなく抑制的にも働くことがあることを明らかにした。

5) ラット正常活性化 T 細胞の IL2R は、還元下で 40-48 kd の major component と 72-77 kd の minor component から成り、major component は、pI に heterogeneity があり、basic component にシアル酸が添加されることにより、IL2R が完成されることを明らかにした。

6) T 細胞ハイブリドーマの IL2R は、NEPHGE による解析で basic component のみから成っていた。さ

らに T 細胞ハイブリドーマは、aberrant IL2R を有していた。又 110 kd の third component を有していた。

文 献

1. Uchiyama, T., Broder, S. and Waldmann, T. H.: A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J. Immunol.* **126**, 1393-1397 (1981).
2. Kohda, H., Uede, T., Yuasa, H., Diamantstein, T. and Kikuchi, K.: Functional and immunohistochemical characterization of cell surface antigens on activated rat T lymphoblasts. *Fed. Proc.* **44**, 788 (1985).
3. Haynes, B. F., Helmer, M. E., Mann, D. L., Eisenbarth, G. S., Shelhamer, J., Mostowski, H. S., Thomas, C. A., Strominger, J. L. and Fanci, A. S.: Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J. Immunol.* **126**, 1409-1414 (1981).
4. Takei, F.: Inhibition of mixed lymphocyte response response by a rat monoclonal antibody to a novel murine lymphocyte activation antigen (MALA-2). *J. Immunol.* **134**, 1403-1407 (1985).
5. Malek, T. R., Robb, R. J. and Shevach, E. M.: Identification and initial characterization of a rat monoclonal antibody reactive with the murine interleukin 2 receptor ligand complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5694-5698 (1983).
6. Osawa, H. and Diamantstein, T.: A rat monoclonal antibody that binds specifically to mouse T lymphoblasts and inhibits IL2 receptor functions: A putative anti-IL2 receptor antibody. *J. Immunol.* **132**, 2445-2450 (1984).
7. Osawa, H. and Diamantstein, T.: The Characteristics of a monoclonal antibody that binds specifically to rat T lymphoblasts and inhibits IL2 receptor functions. *J. Immunol.* **130**, 51-55 (1983).
8. Matsuura, A., Ishii, Y., Yuasa, H., Narita, H., Kon, S., Takami, T. and Kikuchi, K.: Rat T lymphocyte antigens comparable with mouse Lyt-1 and Lyt-2, 3 antigenic systems: characterization by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**, 316-322 (1984).
9. Matsuura, A., Ishii, Y., Narita, H., Iwaki, H., T. Takami, T. and Kikuchi, K.: Analysis of rat hematopoietic tumors with monoclonal antibodies. *Proc. Jpn. Cancer Assoc.* **42**, 153 (1983).
10. Bolton, A. E. and Hunter, W. M.: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem. J.* **133**, 529-539 (1973).
11. Uede, T., Kohda, H., Ibayashi, Y., Osawa, H., Diamantstein, T. and Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors. II. Differential ability of mononuclear cells obtained from various tissues to produce helper factors that are involved in the generation of cytotoxic cells. *J. Immunol.* **135**, 3243-3251 (1985).
12. Uede, T., Ishii, Y., Matsuura, A. and Kikuchi, K.: Thy 1 antigen on rat bone marrow cells: Immunohistochemical and fine morphological studies. *Tohoku J. Exp. Med.* **136**, 391-404 (1982).
13. Uede, T., Ibayashi, Y., Kohda, H. and Kikuchi, K.: Construction of rat-mouse T cell hybridomas that constitutively produce rat IL2. *Hybridoma* **4**, 103-114 (1985).
14. Uede, T., Kohda, H., Ibayashi, Y. and Kikuchi, K.: Establishment of rat-mouse T cell hybridomas that constitutively produce a soluble factor that is needed for the generation of cytotoxic cells: Biochemical and functional characterization. *J. Immunol.* **135**, 3252-3257 (1985).
15. Farrar, J. J., Mizel, S. B., Farrar, J. F., Rerrar, W. L. and Hilsfiker, M. L.: Macrophage-independent activation of helper T cells. I. roduction of interleukin 2. *J. Immunol.* **125**, 793-798 (1980).
16. Gills, S., Ferm, M. M., Ou, W. and Smith, K. A.: T cell growth factor: Parameter of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* **120**, 2027-2032 (1978).
17. Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672 (1949).
18. Uede, T., Kohda, H., Yuasa, H., Osawa, H., Diamantstein, T., Yodoi, J., Ishii, Y. and Kikuchi, K.: 5C6-F4, a novel 100 kd rat lymphocyte activation antigen defined by monoclonal antibody. *J. Immunol.* **136**, 3968-3976 (1986).
19. Hynes, R. and Destree, A.: Extensive disulfide bonding at the mammalian cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2855-2859 (1977).
20. O'Farrell P. Z., Goodman, H. M. and O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-1141 (1977).

21. Robb, R. J., Munck, A. and Smith, K. A.: T cell growth factor receptors. Quantitative, specificity, and biological relevance. *J. Exp. Med.* **154**, 1455-1474 (1981).
22. Cantrell, D. A. and Smith, K. A.: Transient expression of interleukin 2 receptors: Consequences for T cell growth. *J. Exp. Med.* **158**, 1895-1911 (1983).
23. Tsudo, M., Uchiyama, T., Uchino, H. and Yodoi, J.: Failure of regulation of Tac antigen/TCGF receptor on adult T cell leukemia cells by anti-Tac monoclonal antibody. *Blood* **61**, 1014-1016 (1983).
24. Tateno, M., Kondo, N., Itoh, T., Chubachi, T., Togashi, T. and Yoshiki, T.: Rat lymphoid cell lines with human T cell leukemia virus production. *J. Exp. Med.* **159**, 1105-1116 (1984).
25. Yodoi, J., Okada, M., Tagaya, Y., Teshigawara, K., Fukui, K., Ishida, N., Ikuta, K., Maeda, M., Honjo, T., Dsawa, H., Diamantstein, T., Tateno, M. and Yoshiki, T.: Rat lymphoid cell lines producing human T cell leukemia virus. II. Constitutive expression of Rat IL2 receptor. *J. Exp. Med.* **161**, 942-934 (1985).
26. Blumberg, P. M.: *In vitro* studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters: part 1. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **8**, 153-197 (1980).
27. Waterfield, M. D., Scrace, T., Whittle, N., Stroobant, P., Johnsson, A., Wasteson, A., Westermark, B., Heldin, C. H., Huang, J. S., Deuel, T. F.: Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28 of simian sarcoma virus. *Nature* **304**, 35-39 (1983).
28. Doolittle, R. F., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., Devare, S. G., Robbins, K. C., Aaronson, S. A. and Antoniades, H. N.: Simian Sarcoma Virus onc Gene, v-sis, is derived from the Gene (genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* **221**, 275-277 (1983).
29. Robbins, K. C., Antoniades, H. N., Devare, S. G., Hunkapiller, M. W. and Aaronson, S. A.: Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. *Nature* **305**, 605-608 (1983).
30. Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Waterfield, M. D.: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* **307**, 521-525 (1984).
31. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, N., Waterfield, M. D., Seeburg, P. H.: Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**, 418-415 (1984).
32. Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. and Gallo, R.: Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007-1008 (1976).
33. Kern, D. E., Gillis, S., Okada, M. and Henney, C. S.: The role of interleukin 2(IL2) in the differentiation of cytotoxic T cells.: The effect of monoclonal anti-IL2 antibody and absorption with IL2 dependent T cell lines. *J. Immunol.* **127**, 1323-1328 (1981).
34. Gillis, S., Mochizuki, D. Y., Conlon, P. J., Hefeneider, S. H., Ramthun, C. A., Gillis, A. E., Frank, M. B., Henney, C. S. and Watson, J., D.: Molecular characterization of interleukin 2. *Immunol. Rev.* **63**, 167-209 (1982).
35. Tsudo, M., Uchiyama, T. and Uchino, H.: Expression of Tac antigen on activated normal human B cells. *J. Exp. Med.*, **160**, 612-617 (1984).
36. Korsmeyer, S. J., Greene, W. C., Cossman, J., Hsu, S. M., Jensen, J. P., Neckers, L. M., Marsh, S. L., Bakhshi, A., Depper, J. M., Leonard, W. J., Jaffe, E. S. and Waldmann, T. A.: Rearrangment and expression of immunoglobulin genes and expression of Tac antigen in hairy cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4522-4526 (1983).
37. Robb, R. J. and Greene, W. C.: Direct demonstration of the identity of T cell growth factor binding protein and the Tac antigen. *J. Exp. Med.* **158**, 1332-1337 (1983).
38. Abo, T., Miller, C. A., Balch, C. M. and Cooper, M. D.: Interleukin 2 receptor expression by activated HNK-1+granular lymphocytes: a requirement for their proliferation. *J. Immunol.* **131**, 1882-1826 (1983).
39. Helmer, M. E., Brenner, M. B., Mclean, J. M. and Strominger, J. L.: Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin 2 receptor on human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2172-1275 (1984).

40. Hattori, T., Uchiyama, T., Toibana, T. and Takatsuki, K. and Uchino, H.: Surface phenotype of Japanese adult T cell leukemia cells characterized by monoclonal antibodies. *Blood* **58**, 645-647 (1981).
41. Uchiyama, T., Nelson, D. L., Fleisher, T. A. and Waldmann, T. H.: A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. II. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells and on one of two types of helper T cells. *J. Immunol.* **126**, 1398-1403 (1981).
42. Gavin, III J. R., Roth, J., Neville, Jr. D. M., De Meyst, P. and Buel, D. M.: Insulin dependent regulation of insulin receptor concentrations. A direct demonstration in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 84-88 (1974).
43. Reen, G. H. and Ning-Hsing Yeh: Interleukin 2 regulates expression of its receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes. *Science* **225**, 429-430 (1984).
44. Diamantstein, T. and Osawa, H.: The mechanism of induction of interleukin 2(IL-2) receptors: an IL-2-receptor inducing factor, the prerequisite of generation of the receptor. *Immunobiology* **162**, 343-349 (1982).
45. Diamantstein, T. and Osawa, H.: Studies on the interleukin 2 receptor its generation and dynamics using monoclonal anti-IL-2 receptor antibodies. *Mol. Immunol.* **21**, 1229-1236 (1984).
46. Falk, W., Mannel, D. N., Katzer, B., Kaltmann, B., Krammer, P. H., Diamantstein, T. and Droge, W.: Induction of IL2 receptor expression and cytotoxicity of thymocytes by stimulation with TCF1. *J. Immunol.* **135**, 1160-1164 (1985).
47. Teshigawara, K., Maeda, M., Nishino, K., Nikaido, T., Uchiyama, T., Tsudo, M., Wano, Y. and Yodoi, J.: Adult T leukemia cells produce a lymphokine that augments interleukin 2 receptor expression. *J. Mol. Cell. Immunol.* **2**, 17-26 (1985).
48. Yodoi, J., Teshigawara, K., Nikaido, T., Fukui, K., Noma, T., Honjo, T., Takigawa, M., Sasaki, M., Minato, N., Tsudo, M., Uchiyama, T. and Maeda, M.: TCGF(IL2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL2 receptor on a natural killer-like cell line(YT cells). *J. Immunol.* **134**, 1623-1630 (1985).
49. Okada, M., Maeda, M., Tagaya, Y., Taniguchi, Y., Teshigawara, K., Yoshiki, T., Diamantstein, T., Smith, K. A., Uchiyama, T., Honjo, T. and Yodoi, J.: TCGF(IL2)-receptor inducing factors II. Possible role of ATL-derived factor(ADF) on constitutive IL2 receptor expression of HTLV-I (+)T cell lines. *J. Immunol.* **135**, 3995-4003 (1985).
50. Munson, P. J. and Rodbard, D.: Ligand: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* **107**, 220-239 (1984).
51. Smith, K. A. and Cantrell, D. A.: Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 864-868 (1985).
52. Gill, G. N. and Lazar, C. S.: Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells. *Nature* **293**, 305-307 (1981).
53. Buss, J. E., Kudlow, J. E., Lazar, C. S. and Gill, G. N.: Altered epidermal growth factor(EGF)-stimulated protein kinase activity in variant A431 cells with altered growth responses to EGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2574-2578 (1982).
54. Sugamura, K., Nakai, S., Fujii, M. and Hinuma, Y.: Interleukin 2 inhibits *in vitro* growth of human T cell lines carrying retrovirus. *J. Exp. Med.* **161**, 1243-1248 (1985).
55. Hatakeyama, M., Mimanoto, S., Uchiyama, T., Hardy, R. R., Yamada, G. and Taniguchi, T.: Reconstitution of functional receptor for human interleukin-2 in mouse cells. *Nature* **318**, 467-470 (1985).
56. Albert, F., Hua, C., Truneh, A., Pieres, M. and Schmitt-Verhulst, A-M.: Distinction between antigen receptor and IL2 receptor triggering events in the activation of alloreactive T cell clones with calcium ionophore and phorbol ester. *J. Immunol.* **134**, 3649-3655 (1985).
57. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y.: Calciumdependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **254**, 3692-3695 (1979).
58. Costagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **257**, 7847-7851 (1982).
59. Nidel, J. E., Kuhn, L. J. and Vandenbark, G. R.: Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 36-40 (1983).

60. Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. and Nishizuka, Y.: Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **258**, 11442-11445 (1983).
61. Weiss, A., Imboden, J., Shoback, D. and Stobo, J.: Role of T3 surface molecules in human T cell activation: T3-dependent activation results in a rise in cytoplasmic free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4167-4173 (1984).
62. Weiss, A., Wiskocil, R. L. and Stobo, J.: The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: A two-stimulus requirement for IL2 production reflects events occurring at a pretranslational level. *J. Immunol.* **133**, 123-128 (1984).
63. Truneh, A., Albert, F., Golstein, P. and Schmitt-Verhulst, A. M.: Calcium ionophore phorbol ester can substitute for antigen in the induction of cytolytic T lymphocytes from specifically primed precursors. *J. Immunol.* **135**, 2262-2267 (1985).
64. Nikaido, T., Shimizu, A., Ishida, N., Sabe, H., Teshigawara, K., Maeda, M., Uchiyama, T., Yodoi, J. and Honjo, T.: Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature* **311**, 631-635 (1984).
65. Leonard, W. J., Depper, J. M., Crabtree, G. R., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Robb, R. J., Kronke, M., Svetlik, P. B., Pfeffer, N. J., Waldmann, T. A. and Greene, W. C.: Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature* **311**, 626-630 (1984).
66. Osawa, H. and Diamantstein, T.: Partial characterization of the putative rat interleukin 2 receptor. *Eur. J. Immunol.* **14**, 374-376 (1984).
67. Wano, Y., Uchiyama, T., Fukui, K., Maeda, M., Uchino, H. and Yodoi, J.: Characterization of human interleukin 2 receptor (Tac antigen) in normal and aberrant receptors on Hut-102 cells. *J. Immunol.* **132**, 3005-3010 (1984).
68. Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C. and Chinkers, M.: A native 170,000 epidermal growth factor receptor kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **257**, 1523-1531 (1982).
69. Kasuga, M., Zick, Y., Blithe, D. L., Crettaz, M. and Kahn, C. R.: Insulin stimulates threonine phosphorylation of the insulin receptor in a "cell-free" system. *Nature* **298**, 667-669 (1982).
70. Downward, J., Parker, P. and Waterfield, M. D.: Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* **311**, 483-485 (1984).
71. Hunter, T., Ling, N. and Cooper, J. A.: Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature* **311**, 480-483 (1984).
72. Shackelford, D. A. and Trowbridge, I. S.: Induction of expression and phosphorylation of the human interleukin 2 receptor by a phorbol diester. *J. Biol. Chem.* **259**, 11706-11712 (1984).
73. Uede, T., Yuasa, H., Kohda, H., Osawa, H., Diamantstein, T. and Kikuchi, K.: Role of early activation antigens in T cell proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* In the third Colloquium in Biological science: Cellular Signal Transduction. in press (1986).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学病理学第1講座 幸田弘信

ERRATA

THE SAPPORO MEDICAL JOURNAL Vol. 55, No. 5, p. 453, October 1986

Please make corrections with errata

Errors —————> Corrections

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩造 教授)

—————>

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)